

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



Practitioner's Docket No.: 021123-0278405
Client Reference No.: 990012BT-CIP

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of:

Confirmation No: 3863

MOLENAAR et al.

Application No.: 09/852,157

Group No.: 1652

Filed: May 10, 2001

Examiner: D. RAMIREZ

For: PROCESS FOR THE PRODUCTION OF L-AMINO ACIDS BY
FERMENTATION USING CORYNEFORM BACTERIA

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Attached please find the certified copy of the foreign application from which priority is claimed for this case:

<u>Country</u>	<u>Application Number</u>	<u>Filing Date</u>
Germany	199 12 384.5	01/9/2004

Date: January 9, 2004

PILLSBURY WINTHROP LLP
P.O. Box 10500
McLean, VA 22102
Telephone: (703) 905-2000
Facsimile: (703) 905-2500
Customer Number: 00909

Thomas A. Cawley, Jr., Ph.D.
Registration No. 40944

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Bescheinigung

Die Degussa-Hüls AG in Marl, Westf./Deutschland hat eine Patentanmeldung
unter der Bezeichnung

"Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren
unter Verwendung coryneformer Bakterien"

am 19. März 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Der Sitz der Anmelderin wurde geändert in:
Frankfurt am Main/Deutschland.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

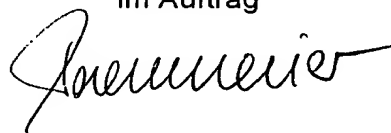
Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole
C 12 P und C 07 C der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 3. Dezember 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag



Waasmaier

Aktenzeichen: 199 12 384.5

**Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren
unter Verwendung coryneformer Bakterien**

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere
5 L-Lysin unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen das mgo-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin finden in der Tierernährung, in der Humanmedizin und in der
10 pharmazeutischen Industrie Anwendung.

Es ist bekannt, daß diese Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien insbesondere Corynebacterium glutamicum hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der
15 Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch
20 z.B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man
25 Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. das Lysin-Analogon S-(2-Aminoethyl)-Cystein oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Aminosäuren sind und L-Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der
30 rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-Aminosäure produzierender Stämme von Corynebacterium

glutamicum eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die L-Aminosäure-Produktion untersucht. Übersichtsartikel hierzu findet man unter anderem bei Kinoshita („Glutamic Acid Bacteria“, in: Biology of Industrial Microorganisms, Demain and Solomon (Eds.), Benjamin Cummings, London, UK, 1985, 115-142), Hilliger (BioTec 2, 40-44 (1991)), Eggeling (Amino Acids 6, 261-272 (1994)), Jetten und Sinskey (Critical Reviews in Biotechnology 15, 73-103 (1995)) und Sahm et al. (Annals of the New York Academy of Science 782, 25-39 (1996)).

Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin finden in der Tierernährung, in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie Anwendung. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran neue, verbesserte Verfahren zur Herstellung dieser Verbindungen bereitzustellen.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt wird, ist damit nicht nur die Base sondern es sind auch die Salze wie z. B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits die gewünschte Aminosäure produzieren und in denen die für das Enzym Malat:Chinon Oxidoreduktase codierende Nucleotidsequenz (mqo-Gen) verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.

Bevorzugte Ausführungsformen finden sich in den Ansprüchen.

Der Begriff „Verstärkung„ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die
5 entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

10 Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es handelt sich um Vertreter coryneformer
15 Bakterien, insbesondere der Gattung Corynebacterium. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

20 Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum, sind die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
25 Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

30 und daraus hergestellte L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin produzierende Mutanten bzw. Stämme, wie beispielsweise

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709
Brevibacterium flavum FERM-P 1708
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
Brevibacterium flavum FERM-P 6463 und
5 Brevibacterium flavum FERM-P 6464.

Die Erfinder fanden heraus, daß coryneforme Bakterien nach
Überexpression der Malat:Chinon Oxidoreduktase in
verbesserter Weise L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin
10 produzieren.

Das mqo-Gen kodiert für das Enzym Malat:Chinon
Oxidoreduktase (EC 1.1.99.16), welches die Oxidation von
Malat zu Oxalacetat unter Weitergabe der Elektronen an
Ubichinon-1 katalysiert (Molenaar et al., European Journal
15 of Biochemistry 254, 395 - 403 (1998)). Die
Nukleotidsequenz des mqo-Gens von Corynebacterium
glutamicum wurde ebenfalls von Molenaar et al. (European
Journal of Biochemistry 254, 395 - 403 (1998)) bestimmt und
ist bei der Nukleotidsequenz Datenbank des National Center
20 for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA)
unter der Accession Number AJ 22 4946 allgemein verfügbar.

Das von Molenaar et al. (European Journal of Biochemistry
254, 395-403 (1998)) beschriebene mqo-Gen von C. glutamicum
kann erfindungsgemäß verwendet werden. Weiterhin können
25 Allele des mqo-Gens verwendet werden, die sich aus der
Degeneriertheit des genetischen Codes oder durch
funktionsneutrale Sinnmutationen (sense mutations) ergeben.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der
entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die
30 Promotor- und Regulationsregion, die sich stromaufwärts des
Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise
wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des
Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare

Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Lysin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird
5 durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine
10 Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und
15 Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EP-B 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology
20 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)) bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides
25 (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Ein Beispiel für ein Plasmid mit dessen Hilfe die Malat:Chinon Oxidoreduktase überexprimiert werden kann ist pRM17 (Molenaar et al., 1998, European Journal of
30 Biochemistry 254, 395 - 403). Plasmid pRM17 beruht auf dem Pendelvektor pJC1, der bei Cremer et al. (Molecular and General Genetics 220, 478 - 480) beschrieben ist.

Zusätzlich kann es für die Produktion der L-Aminosäuren vorteilhaft sein neben der Malat:Chinon Oxidoreduktase ein oder mehrere Enzyme des entsprechenden Biosyntheseweges zu überexprimieren. So kann beispielsweise bei der Herstellung
5 von L-Lysin

- gleichzeitig das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende dapA-Gen überexprimiert werden (EP-B 0 197 335), oder
- gleichzeitig ein S-(2-Aminoethyl)-Cystein - Resistenz
10 vermittelndes DNA-Fragment amplifiziert werden (EP-A 0 088 166).

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Überexpression der Malat:Chinon Oxidoreduktase unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten
15 (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms“, in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können
20 kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte
25 Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag,
30 Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen

von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der

Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika
5 hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff enthaltende Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die
10 Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum der gewünschten L-Aminosäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch
15 Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

Das Corynebacterium glutamicum Stamm DM22/pRM17 wurde unter der Nummer DSM12711 bei der Deutschen Sammlung von
20 Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) nach dem Budapester Vertrag hinterlegt.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren insbesondere L-Asparaginsäure, L-Asparagin, L-Homoserin, L-Threonin, L-
25 Isoleucin und L-Methionin mit coryneformen Bakterien, insbesondere der Herstellung von L-Lysin.

Beispiele

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Zu diesem Zweck wurden Versuche mit dem L-Lysin
5 produzierenden *Corynebacterium glutamicum* Stamm DSM5715,
(EP-B- 0 435 132) durchgeführt, in denen die
Vorteilhaftigkeit des beanspruchten Verfahrens deutlich
wird:

Beispiel 1

10 Herstellung von L-Lysin-Produzenten mit verstärkter
Malat:Chinon Oxidoreduktase

Der Stamm DSM5715, wurde wie bei Liebl et al. (FEMS
Microbiology Letters 65, 299-304 (1989)) mit dem Plasmid
pRM17 (Molenaar et al., 1998, European Journal of
15 Biochemistry 254 (395 - 403)) transformiert. Die Selektion
der Transformanten erfolgte auf LBHIS-Agar, der mit 25 mg/l
Kanamycin supplementiert worden war. LBHIS-Agar besteht aus
LB Medium (Sambrook et al. (Molecular Cloning a Laboratory
Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratories)), das mit
20 37 g/l Hirn Herz Bouillon der Firma Merck (Darmstadt,
Deutschland), 0,5 M Sorbitol und 15 g/l Agar-Agar
supplementiert wurde. Auf diese Weise entstand der Stamm
DSM5715/pRM17. Der Stamm DSM5715/pJC1 wurde auf die gleiche
Weise hergestellt.

25 Beispiel 2

Herstellung von L-Lysin

Die Stämme DSM5715/pRM17 und DSM5715/pJC1 wurden zunächst
auf Hirn-Herz Agar, der mit Kanamycin (25 mg/l)
supplementiert worden war, für 24 Stunden bei 33°C
30 inkubiert. Für die Kultivierung in Flüssigmedium wurde

Medium CgIII (Kase & Nakayama, Agricultural and Biological Chemistry 36 (9) 1611- 1621 (1972)) verwendet, das zusätzlich mit Kanamycin (25 mg/l) supplementiert worden war. Hierzu wurden 10 ml Medium, die in 100 ml

- 5 Erlenmeyerkolben mit 4 Schikanen enthalten waren, mit einer Impföse des Stammes angeimpft und die Kultur für 16 Stunden bei 240 rpm und 30°C bebrütet. Diese Kultur wurde anschließend als Vorkultur weiterverwendet.

- Als Produktions- bzw. Testmedium wurde das Medium MM
10 verwendet, das zusätzlich mit Kanamycin (25 mg/l) supplementiert worden war.

Bei dem Verfahren mit Stamm DSM5715 enthielten die entsprechenden Medien kein Kanamycin.

- Die Zusammensetzung und Herstellung des Mediums MM war wie
15 folgt:

Corn Steep Liquor (CSL)	5 g/l
3-Morpholino-Propansulfonsäure (MOPS)	20 g/l
Glucose	50 g/l (getrennt autoklaviert)

20

Salze:

(NH ₄) ₂ SO ₄)	25 g/l	
KH ₂ PO ₄	0,1 g/l	
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,0 g/l	
25 CaCl ₂ *2H ₂ O	10 mg/l	
FeSO ₄ * 7H ₂ O	10 mg/l	
MnSO ₄ *H ₂ O	5,0mg/l	
Biotin	0,3 mg/l	(sterilfiltriert)
30 Thiamin*HCl	0,2 mg/l	(sterilfiltriert)
CaCO ₃	25 g/l	
Leucin	0,1 g/l	

CSL, MOPS und die Salzlösung wurden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend wurden die sterilen Substrat und Vitaminlösungen sowie das trocken autoklavierte CaCO₃ zugesetzt.

5

Die Kultivierung erfolgte in 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen, die mit 10 ml des oben beschriebenen Produktionsmediums beschickt worden waren. Die Kulturen wurden so mit der Vorkultur angeimpft, daß die optische
10 Dichte beim Start 0,1 betrug. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchte.

Nach 72 Stunden Inkubation wurde die optische Dichte der Kultursuspension und die Konzentration an gebildetem L-
15 Lysin bestimmt. Die optische Dichte wurde mit einem LP2W-Photometer der Firma Dr. Lange (Berlin, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 660 nm bestimmt. L-Lysin wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie
20 und Nachsäulenreaktion mit Ninhydrindetektion bestimmt. In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD	L-Lysin g/l
DSM5715	10,1	16,4
DSM5175/pJC1	9,9	16,5
DSM5715/pRM17	10,2	17,8

**Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren
unter Verwendung coryneformer Bakterien**

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren durch
5 Fermentation coryneformer Bakterien,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Bakterien einsetzt, in denen man die für die
Malat:Chinon Oxidoreduktase codierenden
Nucleotidsequenzen verstärkt, insbesondere
10 überexprimentiert.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich
weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-
15 Aminosäure verstärkt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Bakterien einsetzt, in denen die
Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet
20 sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure
verringern.
4. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden
Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten
Stamm einsetzt und der Plasmidvektor die für die
Malat:Chinon Oxidoreduktase codierende Nucleotidsequenz
trägt.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4,
30 dadurch gekennzeichnet,
daß man mit dem Plasmidvektor pRM17 hinterlegt in

Corynebacterium glutamicum, unter der Nummer DSM12711, transformierte Bakterien einsetzt.

6. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
5 dadurch gekennzeichnet,
daß man coryneforme Bakterien verwendet, die L-Asparaginsäure, L-Asparagin, L-Homoserin, L-Threonin, L-Isolencin oder L-Methionin herstellen.
7. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis
10 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß man coryneforme Bakterien verwendet, die L-Lysin herstellen.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7,
15 dadurch gekennzeichnet,
daß gleichzeitig das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende dapA-Gen überexprimiert wird.
9. Verfahren gemäß Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß gleichzeitig ein S-(2-Aminoethyl)-Cystein-Resistenz vermittelndes DNA-Fragment amplifiziert wird.
10. Verfahren zur fermentativen Herstellung von
L-Aminosäuren gemäß einem oder mehreren der
vorhergehenden Ansprüche,
25 dadurch gekennzeichnet,
daß man folgende Schritte durchführt:
 - a) Fermentation der die gewünschten L-Aminosäure produzierenden Bakterien, in denen zumindest das Malat:Chinon Oxidoreduktase -Gen verstärkt wird.
 - 30 b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien und
 - c) Isolieren der produzierten L-Aminosäure.

Zusammenfassung

**Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren
unter Verwendung coryneformer Bakterien**

Die Erfindung betrifft einVerfahren zur fermentativen
5 Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung coryneformer
Bakterien, in denen das mqo-Gen verstärkt wird.